



MAILED 06 JAN 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété

industrielle certifie que le document ci-joint est la copie
certifiée conforme d'une demande de titre de propriété
industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 21 OCT. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

Best Available Copy



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 0 H / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 7 JUIL 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0308289 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 7 JUIL. 2003		<input checked="" type="checkbox"/> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) CP 61032			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation FRANCE Date 1 8 1 0 2 0 0 2 N° 02130022 Pays ou organisation _____ N° _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)	
Prénoms		_____	
Forme juridique		Etablissement Public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3, Rue Michel-Ange	
	Code postal et ville	7 5 7 9 4 PARIS CEDEX 16	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)		_____	
<input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE DES PIÈCES DATE 7 JUIL 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0308289 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		PEAUCELLE	
Nom		Chantal	
Prénom			
Cabinet ou Société		Cabinet ARMENGAUD AINE	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		92-1189	
Adresse	Rue	3, Avenue Bugeaud	
	Code postal et ville	75116 PARIS	
	Pays	FRANCE	
N° de téléphone (facultatif)		01-45-53-05-50	
N° de télécopie (facultatif)		01-45-53-80-21	
Adresse électronique (facultatif)		armengau@club-internet.fr	
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>	
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Le 7 juillet 2003		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. MARIELLO	



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ
Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Page suite N° 1.../1...



RÉSERVÉ À L'INPI	
REMISE DES PIÈCES	
DATE	7 JUIL 2003
LIEU	/5 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0308289
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 829 @ W / 010702

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP 61032
<input checked="" type="checkbox"/> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation France Date 1 8 1 0 2 0 0 2 N° 02 13 022 Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N°
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE VICTOR SEGALEN
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement Public
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	146, Rue Léon-Saignat
	Code postal et ville	13 13 0 7 1 6 BORDEAUX
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE DE POITIERS
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement Public
N° SIREN		
Code APE-NAF		
Domicile ou siège	Rue	Hôtel Pinet 15 Rue de l'Hôtel Dieu
	Code postal et ville	18 16 0 3 4 POITIERS CEDEX
	Pays	FRANCE
Nationalité		Française
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<input checked="" type="checkbox"/> SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		Mandataire : Chantal PEAUCELLE 92-1189 Le 7 juillet 2003
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. MARIELLO

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI

Criblage de molécules à activité anti-prion :
kits, méthodes et molécules criblées.

La présente invention se rapporte à du criblage de molécules à
5 activité anti-prion. Elle vise plus particulièrement des kits
de criblage de molécules à activité anti-prion, les méthodes
de criblage, et une famille de molécules à activité anti-prion
mise en évidence à l'aide du crible selon l'invention.

10 Les prions sont des protéines infectieuses responsables chez
les mammifères de certaines maladies neuro-dégénératives de
type encéphalopathies spongiformes comme la maladie de
Creutzfeldt-Jakob chez l'homme ou encore les maladies dites
15 « de la vache folle » chez les bovins ou « tremblante du
mouton » chez les ovins. Ces différentes maladies sont
provoquées par des agents infectieux non conventionnels : à la
différence des agents infectieux traditionnels (bactéries,
virus par exemple), ils ne contiennent pas d'acides
nucléiques. Le Professeur Stanley Prusiner a formulé
20 l'hypothèse de « la protéine seule », selon laquelle l'agent
infectieux ne serait constitué que d'une protéine. Cette
protéine existe naturellement dans les cellules sous une forme
« normale » (ou PrP^{C}), c'est-à-dire soluble, essentiellement
sous forme d'hélice α et non agrégée donc fonctionnelle. Dans
25 certaines conditions encore inconnues, cette protéine peut se
transformer en une forme prion (ou PrP^{Sc}). Sous cette forme
prion, la protéine forme des agrégats insolubles,
essentiellement sous forme de feuillets β . Le caractère
infectieux de cette conformation prion PrP^{Sc} viendrait du fait
30 que, outre les caractéristiques indiquées précédemment, la
protéine sous forme prion gagne également la capacité à
catalyser le passage de la forme cellulaire normale PrP^{C} vers
la forme prion PrP^{Sc} dans un mécanisme de type « boule de
neige ».

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* contient plusieurs protéines se comportant comme des prions (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dès les années soixante, deux mécanismes génétiques non conventionnels y sont décrits. En 1994, les phénotypes correspondants [PSI+] et [URE3] ont été proposés comme résultant de l'inactivation auto-catalytique des protéines Sup35p et Ure2p respectivement. Ces protéines prions présentent donc a priori une analogie mécanistique avec les systèmes mammifères délétères pour la santé publique. A l'instar de la protéine PrP, la protéine Sup35p « normale » passe d'un état soluble à un état insoluble et agrégé dès que la protéine est en contact avec une autre protéine Sup35p sous la forme prion. Cet état agrégé est vérifié tant par des expériences de centrifugation que par des expériences de localisation intracellulaire. Les prions de la levure peuvent être éliminés (« curés ») par une forte dose (1 à 5 mM) de chlorure de guanidium. Suite à un tel traitement (qui doit être appliqué sur au moins six à dix générations), les agrégats protéiques générés par la présence des prions disparaissent et la protéine en question (Sup35p, par exemple) se retrouve sous une forme normale, soluble, fonctionnelle mais ayant conservé la susceptibilité d'être convertie sous une forme prion si elle se retrouvait à nouveau en contact avec une autre protéine Sup35p dans un tel état.

La protéine Sup35p, en complexe hétérodimérique avec la protéine Sup45p, forme un facteur de terminaison de la traduction. Ce facteur reconnaît les codons stop opales (UGA). Sous sa forme cellulaire normale (soluble et active) dans les souches [psi-], Sup35p, en association avec Sup45p termine efficacement la traduction au niveau de ces codons opales. Dans une souche [PSI+] où la protéine Sup35p est sous forme prion, elle est majoritairement présente sous forme d'agrégats

insolubles. Ne pouvant pas se lier à Sup45p, elle est ainsi non fonctionnelle dans la terminaison de la traduction. Une petite fraction de l'ensemble des protéines Sup35p cellulaires reste toutefois soluble dans ces cellules [PSI+] où elle permet, en complexe avec Sup45p, d'assurer un « service minimum » de terminaison de la traduction, service essentiel à la survie de la levure. Un système colorimétrique permettant de détecter, de façon indirecte, la forme sous laquelle la protéine Sup35p est présente : normale ou prion, a été élaboré à partir de ces constatations. Ce système, décrit depuis longtemps (voir l'article de synthèse par Fernandez-Bellot et Cullin, 2001), est basé sur l'utilisation de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine : la SAICAR synthétase. Cette enzyme catalyse la formation de 4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole ribonucléotide (SAICAR) à partir de 4-carboxy-5-aminoimidazole ribonucléotide (CAIR). L'allèle *ade1-14* contient un codon opale dans le cadre de lecture du gène *ADE1*. Dans une souche [psi-], Sup35p en association avec Sup45p va donc arrêter la traduction du gène *ADE1* au niveau de ce codon stop. La protéine *ade1-14p* ainsi traduite sera tronquée et donc non fonctionnelle. En conséquence les substrats en amont de l'enzyme Adelp vont s'accumuler, notamment la 5-aminoimidazole ribonucléotide (AIR). L'AIR étant oxydé en un composé de couleur rouge, les colonies formées par les cellules [psi-] seront de couleur rouge. En outre, ces cellules seront auxotrophes pour l'adénine. A l'inverse, dans une souche [PSI+], la protéine Sup35p est essentiellement présente sous forme d'agrégats donc incapable de s'associer avec Sup45p pour stopper la traduction au niveau du codon opale de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*. En conséquence, les ribosomes vont faire une pause au niveau de ce codon stop avant de reprendre leur activité de traduction (translecture). Une certaine quantité de protéine Adelp fonctionnelle sera donc synthétisée, les

cellules seront autotrophes pour l'adénine et formeront des colonies de couleur blanche à rosée.

5 Dans un article paru dans P.N.A.S, l'équipe du Pr. Stanley Prusiner divulgue un test de détection de molécules à activité anti-prion (Korth et al., 2001). Ce test est effectué sur un modèle de mammifères (neuroblastomes murins infectés par PrP^{sc}). Les conditions de sécurité (laboratoire P3) et de cultures cellulaires (manipulations assez lourdes) ne
10 permettent pas de réaliser du criblage à haut débit.

La demande WO 98/30909 décrit également un procédé de criblage de molécules à activité anti-prion réalisé sur des rongeurs infectés par un agent transmissible non conventionnel. Cette
15 méthode de criblage présente les mêmes limites que la méthode décrite dans P.N.A.S.

Les travaux des inventeurs les ont amenés à réaliser un système de criblage haut débit pour mettre en évidence des
20 molécules possédant une activité anti-prion, basé sur le système rapporteur colorimétrique de la protéine Sup35p, décrit ci-dessus.

La présente invention est donc relative à un kit de criblage
25 de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.

Bien que basé sur les prions des levures, le kit selon
30 l'invention permet d'isoler des molécules actives contre les prions de mammifères. L'exemple 7 suivant montre que les molécules les plus actives isolées par le Pr. Prusiner présentent également une activité dans le crible selon l'invention.

Pourtant, on observe de nombreuses différences entre les prions de levure et les prions de mammifères. Dans un article de la revue « Cellular and Molecular Life Sciences », le Professeur C.Cullin propose même au vu de ces différences de distinguer les prions de levures de ceux des mammifères en employant le terme de « propagons ». Comme différences notables entre les « prions » (mammifères) et les « propagons » (levure), on peut citer le caractère cytoplasmique des propagons alors que le prion PrP des mammifères est une protéine ancrée à la membrane plasmique, le caractère pathologique des prions de mammifères, ainsi qu'un certain nombre de différences biophysiques (structure tertiaire et quaternaire, réversibilité du curage...)

15

L'un des principaux avantages d'un tel crible réside dans sa parfaite innocuité ce qui permet de le réaliser dans un laboratoire de biologie moléculaire classique de niveau L2, et non, comme requis dans les techniques antérieures, dans un laboratoire de niveau P3.

20

De plus, la grande facilité d'utilisation et le très faible coût de ce kit rend le criblage à haut débit réalisable. L'utilisation de l'antibiogramme permet en outre de tester en une seule expérience un gradient de concentrations, contrairement aux tests classiques, dans lesquels seule une concentration est testée. Pour chaque molécule dont on teste l'activité anti-prion, l'utilisation de l'antibiogramme permet également d'avoir des informations sur la toxicité du produit ainsi que sur le rapport activité/concentration, et de déterminer ainsi la meilleure concentration efficace.

30

Selon un mode de réalisation préféré, la souche [PSI+] utilisée dans le kit selon l'invention porte une inactivation du gène *ERG6*.

5 En effet, les levures sont naturellement assez peu perméables. En particulier, la levure préférée pour la mise en œuvre de l'invention, *Saccharomyces cerevisiae*, présente une imperméabilité telle que la réalisation d'un criblage s'avère particulièrement peu efficace sans cette inactivation.

10

La méthode d'analyse du crible selon l'invention est visuelle. Selon l'activité anti-prion de la molécule testée, les colonies de cellules auront une coloration rouge, rosée ou blanche. Le choix de la souche de levure peut permettre
15 d'améliorer le contraste entre les colonies. En effet, certaines souches dites « Strong » facilitent l'analyse visuelle du crible. De telles souches possèdent un fort niveau d'agrégation des formes prions. A contrario, la souche sera dite « Weak ». Les souches préférées pour la mise en œuvre de
20 l'invention sont donc les souches de type « Strong ».

D'autres levures peuvent également être utilisées. On citera à titre d'exemples : *Kluyveromyces lactis*, *Pichia methanolica*,
25 *Saccharomyces ludwigii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia pastoris*, *Zygosaccharomyces rouxi*, *Schizosaccharomyces pombe*.

Etant donné la létalité synthétique observée entre l'inactivation du gène *ERG6* et l'inactivation du gène *TRP1*, le gène *ERG6* pourra être délété en utilisant le gène *TRP1* comme
30 marqueur de délétion.

Avantageusement, le kit comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.

Par curage, on entend une élimination des formes prions dans les cellules de levure. Cette élimination peut être temporaire ou définitive.

- 5 A titre d'exemple, un agent de curage pour le prion peut être l'eau oxygénée ou préférentiellement, le chlorure de guanidium.

10 Par doses sub-efficaces, on entend des doses qui utilisées seules ne suffiraient pas à curer les prions des levures. Les valeurs de telles doses sont données, dans les exemples qui suivent, pour le chlorure de guanidium.

- 15 Les intérêts de la présence d'un agent de curage à des doses sub-efficaces sont de renforcer la sensibilité du crible et d'obtenir un meilleur contraste.

20 Le kit selon l'invention peut être mis en œuvre dans une méthode de criblage de molécules à activité anti-prion. Cette méthode de criblage, également visée par l'invention, est caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :

- 25 a. réalisation d'un tapis de cellules *in vitro*
b. dépôt des composés à tester selon la méthode de l'antibiogramme,
c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.

- 30 Cette méthode possède des avantages analogues à ceux du kit selon l'invention. Il s'agit d'un test visuel, très facile à analyser. Sa mise en œuvre est très simple et peu onéreuse. Les précautions relatives à la sécurité sont celles d'un laboratoire classique de biologie moléculaire. Elle permet le

criblage massif : une personne seule peut cribler manuellement plus de 400 produits par jour. Un criblage de très haut débit serait possible par automatisation de la méthode. Le résultat du crible est révélé au bout de 7 jours, sans qu'il soit
 5 nécessaire de recourir à des manipulations lourdes entre le jour J et le jour J+7 (éventuellement un changement de température de l'incubateur). Enfin, cette méthode est particulièrement économique.

10 Selon un mode de réalisation préféré, la méthode de criblage selon l'invention est caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé. Une des levures préférées pour la mise en œuvre de cette méthode est *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Avantageusement, l'étape a. de la méthode de criblage comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

La méthode peut également comporter les étapes suivantes :

- 20 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C, et/ou,
 f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

 L'incubation à 2-6°C permet d'accentuer le contraste des
 25 colorations des colonies.

Préférentiellement, le test de criblage secondaire pourra comporter les étapes suivantes :

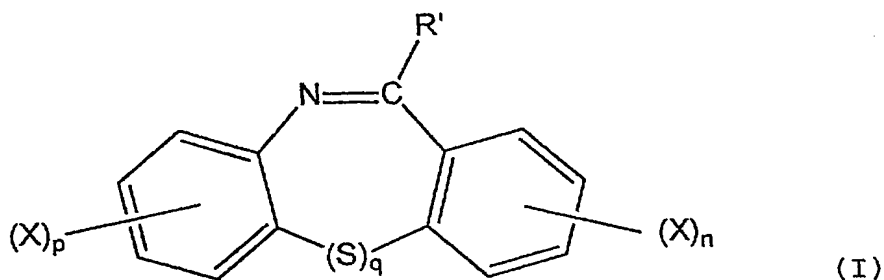
- 30 - construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
 - réalisation des étapes a. à e. de la méthode de criblage selon l'invention, l'étape a. comportant en

outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

Un tel crible secondaire permet de tester très rapidement si les molécules isolées lors du crible primaire peuvent avoir un effet général sur les prions chez la levure. En effet, les gènes *SUP35* (responsable du prion [*PSI+*]) et *URE2* (responsable du prion [*URE3*]) codent pour des enzymes ayant des fonctions totalement différentes et dont les séquences primaires sont très éloignées.

L'invention couvre également les molécules isolées par la méthode de criblage selon l'invention.

En particulier, la méthode de criblage a permis d'isoler des agents anti-prion ayant la formule (I) suivante :



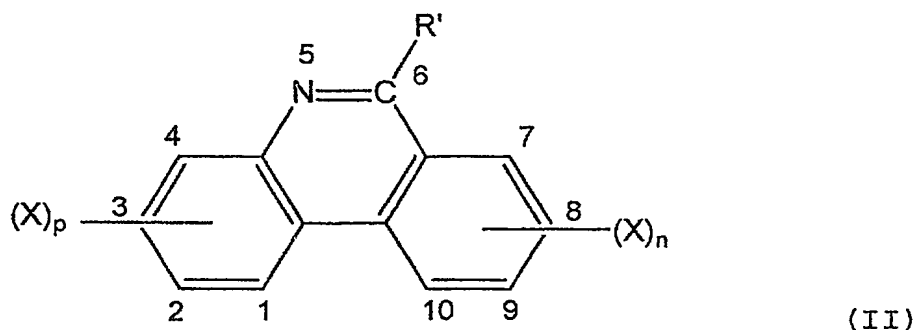
dans laquelle R' est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SR^3 , OR^3 , OH , NO_2 , COR^3 , $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones, de préférence CH_3 .

p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,

q égale 0 ou 1.

Elle vise plus particulièrement les agents anti-prion de formule (II) :



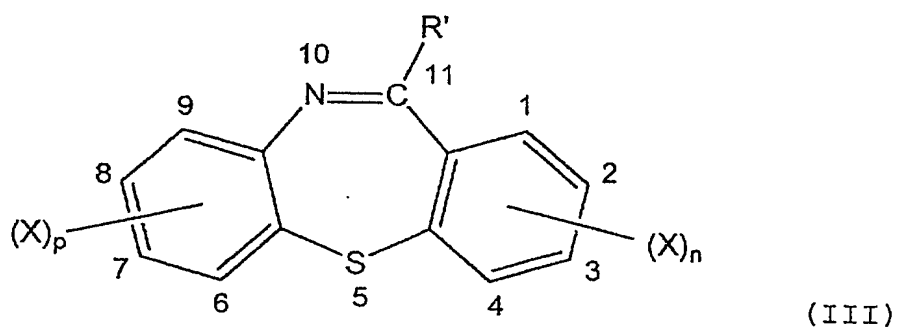
dans laquelle R' représente un groupement H, NH₂, NH-(CH₂)₃-N(CH₃)₂, NH-CH(CH₃)-(CH₂)₃-N(CH₂-CH₃)₂,

X représente F, Cl, CF₃,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

Certains composés de cette famille sont particulièrement actifs. Il s'agit de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine, ainsi que de leurs dérivés chlorés, en particulier lorsque le chlore est placé en position 8, 9, 10, de préférence, en position 10 (voir dans les exemples qui suivent).

L'invention couvre en particulier les agents anti-prion de formule (III) :



dans laquelle R' représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-$
 $N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,
 X représente F , Cl , CF_3 ,
 p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou
 2.

Cette famille de molécules, appelée « Kastellpaolitines » par
 les inventeurs, possède à un degré plus ou moins fort
 l'activité anti-prion recherchée. En particulier, les dérivés
 chlorés de cette famille sont particulièrement efficaces. Les
 meilleures efficacités sont obtenues lorsque le chlore est
 placé en position 2, 3, 4, de préférence, en position 4 (voir
 KP1 dans les exemples qui suivent).

Préférentiellement, dans les formules (II) et (III), R'
 représente NH_2 . En effet, une très bonne activité des molécules
 a été constatée lorsque R' représente NH_2 .

Les agents anti-prion selon l'invention sont particulièrement
 utiles pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir
 et/ou à traiter les maladies neurodégénératives, en
 particulier de type à agrégation de protéines, telle que les
 encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer (tau),
 Parkinson (synucléine α) et de Huntington (huntingtine)... Ces
 médicaments peuvent être à visée humaine ou vétérinaire, en
 particulier pour des animaux domestiques (vaches, moutons, ...)
 ou sauvages (lynx, cervidés tels que biches, élans, ...)

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention
 apparaîtront dans les exemples ci-dessous et en se référant
 aux figures suivantes:

- la figure 1 se rapporte à la faisabilité du crible,
- la figure 2 illustre le protocole de criblage,

- la figure 3 est relative à l'isolement des Kastellpaolitines, de la phénanthridine et à leur relation structure/activité,
- la figure 4 se rapporte à la détermination de l'activité des dérivées de la phénanthridine,
- la figure 5 présente les résultats des tests de cure liquide,
- la figure 6 se rapporte au crible secondaire basé sur le prion [URE3],
- la figure 7 démontre la validation du test avec la chlorpromazine, la quinacrine et le verapamil,
- la figure 8 présente les résultats de l'effet de KP1 sur le prion mammifère dans un modèle *in vitro*, et,
- la figure 9 est relative à une étude structure/activité réalisée sur la molécule de formule générale (II).

Exemple 1 : Réalisation du crible.

1. Matériel et méthodes

Organismes (*Saccharomyces cerevisiae*) et milieux de culture

La souche de levure haploïde [PSI⁺] 74-D694 (Mat a, adel-14, trp1-289, his3-Δ200, ura3-52, leu2-3,112) a été utilisée dans la mise au point de la méthode de criblage. La souche utilisée est dite « Strong » car elle présente un phénotype bien marqué lorsque le facteur de terminaison de la traduction Sup35p est sous une forme prion ou agrégée.

Afin d'augmenter la pénétration des inhibiteurs, les inventeurs ont modifié génétiquement cette souche en y introduisant une mutation du gène *ERG6*. Ce gène intervient dans la biosynthèse de l'ergostérol, composant de la paroi cellulaire des levures. La mutation a été réalisée par

insertion au niveau du site chromosomique du gène *ERG6* d'une « cassette de délétion » correspondant au gène marqueur *TRP1* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *ERG6*. Cette cassette a été
 5 produite par PCR en utilisant le plasmide pFA6a-kanMX6 comme matrice et les oligonucléotides oBM1060 (5') et oBM1061 (3') comme amorces. Les cellules de levure 74-D694 « *Strong* » ayant intégré la cassette de délétion (souche appelée *STRg6*, déposée à la CNCM le 10 octobre 2002 sous le numéro I-2943) sont
 10 celles qui se développent sur milieux minimum dépourvu en tryptophane. La mutation $\Delta erg6::TRP1$ a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche *STRg6* comme matrice et les oligonucléotides oBM1030 (5') et oBM1063 (3') comme amorces.

15

Les amorces PCR utilisées présentent les séquences en nucléotides suivantes :

oBM1060 5' CGATTTAAGTTTTACATAATTTAAAAACAAGAATAAAATAATAATATAG
 TAGGCAGCATAAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3' (SEQ ID N°1)

20 oBM1061 5' CTGCATATATAGGAAAATAGGTATATATCGTGCGCTTTATTTGAATCTTAT
 TGATCTAGTGAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3' (SEQ ID N°2)

oBM1030 5' GGTACCTCGTTCCCGTAC 3' (SEQ ID N°3)

oBM1063 5' CAGTCAGAAATCGAGTTCCA 3' (SEQ ID N°4)

25 Sauf indication du contraire, les souches de levure sont cultivées à 30°C dans du milieu riche (YPD ψ) ou dans du milieu minimum. Lorsque ce n'est pas explicitement spécifié, les pourcentages correspondent à un rapport masse/volume. La forme gélosée est obtenue par ajout d'agar à 2%.

30 YPD ψ : 1% d'extrait de levure (FISHER®), 2% de peptone (GIBCO®) et 2% de glucose ;

Milieu minimum : 0,175% de yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate (Difco®), 0,75% de sulfate d'ammonium et 2% de glucose. Ce milieu est amené à pH 6. Afin de

compenser les éventuelles auxotrophies, ce milieu peut être complété, après stérilisation, par ajout d'acides aminés (0,002% de L-Histidine et/ou 0,004% de L-Leucine et/ou 0,003% de L-Tryptophane) ou de bases azotées (0,0025% d'Uracile et/ou 5 0,008% d'Adénine).

Méthode de criblage de substances à activité anti-prionesque (« Prion Halo Assay »)

La méthode de criblage élaborée est basée sur le principe de 10 l'antibiogramme. En effet, les composés à tester sont déposés sur un disque en papier filtre stérile, lui-même déposé sur une boîte de milieu YPD ψ solide contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium préalablement ensemencée avec environ 10^6 cellules de la souche STRg6 afin de réaliser un tapis de levure. 15 L'ajout d'une faible quantité de chlorure de guanidium (0,2 mM), dose sub-efficace pour curer les prions chez la levure (la dose efficace étant de l'ordre de 1 à 5 mM) permet d'augmenter la sensibilité du test (voir la partie Résultats). Les boîtes carrées de 12 cm de côté sont ensuite incubées 3 20 jours à 23,5°C pour permettre l'apparition et la croissance des colonies de levures. Ces boîtes sont ensuite stockées 3 jours à 4°C afin d'accentuer la coloration rouge présente autour des disques imbibés de substances actives sur la forme prion de la protéine Sup35p. La comparaison avec les témoins 25 négatifs (dépôt du solvant des inhibiteurs testés) et positif (dépôt d'une solution de chlorure de guanidium à 300 mM, provoquant une élimination efficace des protéines Sup35p sous une forme prion) permet de juger de l'efficacité d'un composé. La figure 2 illustre le protocole de la méthode de criblage : 30 (1) Culture de la souche STRg6 ; (2) Dépôt et étalement avec des billes de verre stériles de 3 & 4 mm de diamètre, d'environ 10^6 cellules en phase exponentielle de croissance sur une boîte de milieu solide YPD ψ contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium : constitution du "tapis" de cellules ; (3)

Dépôt des disques de papier filtre stériles selon un quadrillage permettant l'analyse de 32 composés (témoins inclus) et dépôt de 20 µl maximum de chacun des produits à tester ; (4) Incubation ; (5) Numérisation du résultat obtenu ; (6) Exemple présentant l'isolement d'un composé présentant une forte activité anti-prion.

Synthèse de 11-aminodibenzo[b,f] [1,4] thiazépines et de la 6-aminophénanthridine

10 Les 11-aminodibenzo[b,f] [1,4]thiazépines, appelés encore Kastellpaolitines, peuvent être préparés en une seule étape. La synthèse de ces produits a déjà été décrite dans la publication de Mettey et al., 1997.

15

2. Résultats

Principe et faisabilité du crible

Le chlorure de guanidium, le seul produit connu pour curer efficacement les prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a servi non seulement de témoin positif tout au long du criblage, mais aussi pour étudier la faisabilité de la méthode ainsi que pour la mettre au point. Le chlorure de guanidium cure efficacement les différents prions de levure à une dose comprise entre 1 et 5 mM (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dans ces conditions, la cure nécessite une présence constante de ce produit pendant six à dix générations en phase exponentielle de croissance compromettant la faisabilité du crible sur boîte tel que les inventeurs souhaitaient le réaliser.

La figure 1 montre la faisabilité du crible.

Les trois panneaux de gauche : une souche [*PSI+*] est cultivée pendant 48H en présence de chlorure de guanidium à 5 mM (avec

0,2% DMSO final) ou, comme contrôle avec seulement 0,2% DMSO final. A T = 0, puis toutes les 24H, une goutte de 10 μ L (environ 10^4 cellules) est déposée sur une boîte de milieu riche. La cure au chlorure de guanidium commence à avoir un effet après 24H de traitement, soit après 6 générations environ (une coloration rosée commence à apparaître). Au bout de 48H, soit après 12 générations environ, la goutte de cellules présente une coloration nettement rouge, signe d'une cure complète des cellules [PSI+].

10 Le panneau du milieu : quelques cellules sont prélevées à T = 48H et sont striées sur un milieu frais. Elles forment presque toutes des colonies rouges dans le cas de la cure au chlorure de guanidium.

15 Le panneau de droite : ces même cellules sont culottées au fond d'un tube Eppendorf après culture liquide. Dans le cas de la cure au chlorure de guanidium, elles forment un culot rouge.

20 La première étape a donc consisté à déterminer si le chlorure de guanidium pouvait avoir un effet visualisable sur boîte sur des cellules [PSI+] avec le système de pastilles à antibiogramme. Une fois cette étape réalisée, les inventeurs ont mis au point les conditions optimales de température, de milieu, de densité ainsi que de type cellulaire à utiliser (figure 2). La souche présentant la meilleure sensibilité est la souche STRg6 cultivée à 23,5 °C et en présence de 200 μ M de chlorure de guanidium. En effet, l'introduction d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium dans le milieu permet d'augmenter la sensibilité du test.

30

Criblage d'une chimiothèque

Des composés (environ 1000) ont été passés au crible en utilisant les conditions optimisées par les inventeurs (figure 2). Sur chaque boîte, 15 μ L de DMSO sont déposés sur le filtre

en haut à gauche (témoin négatif) et 15 μ l d'une solution de chlorure de guanidium en solution à 300 mM dans le DMSO (témoin positif) sont déposés sur le filtre en bas à droite. Le même volume (15 μ l) de chacun des produits de la banque
5 (tous en solution à 10 mM dans le DMSO) est déposé sur les filtres restants (trente par grande boîte de Pétri carrée). Un signal positif (visualisation d'un halo rouge autour du disque de papier filtre stérile sur lequel le produit est déposé) a été obtenu pour cinq produits. Ces produits correspondent à
10 quatre molécules d'une même famille, appelées « Kastellpaolitines » par les inventeurs, et à une cinquième bien connue : la phénanthridine.

15 Exemple 2 : Identification des Kastellpaolitines et de la phénanthridine.

Les structures chimiques des Kastellpaolitines et de la phénanthridine sont présentées dans la figure 3B. Le panneau
20 3A montre une analyse comparative de la taille des halos rouges obtenus respectivement avec l'ensemble de ces molécules (toutes déposées en quantité équivalentes : 15 μ l d'une solution à 10 mM dans le DMSO). Cette expérience permet de comparer l'activité relative de chacun de ces produits. Le
25 plus actif est la Kastellpaolitine 1 (ou KP1) suivi par la phénanthridine.

Synthèse et test de la 6-aminophénanthridine

30 Une analyse comparative de la phénanthridine d'une part, et des Kastellpaolitines d'autre part montre plusieurs points communs entre ces deux groupes de molécules (figure 3). Les différentes molécules y sont classées de la moins active à la plus active et leurs formules respectives indiquées. Toutes

sont tri-cycliques, le cycle central contenant dans tous les cas un azote en double liaison avec un carbone adjacent. Par contre, chez toutes les Kastellpaolitines, le carbone du cycle central qui est en double liaison avec cette azote porte un groupement amino, ce qui n'est pas le cas pour la phénanthridine. Cette observation a conduit les inventeurs à vouloir tester la 6-aminophénanthridine.

La 6-aminophénanthridine peut être préparé selon le mode opératoire mis au point par Kessar et al, 1969.

La 6-aminophénanthridine a donc été passée au crible selon l'invention, en comparaison avec les Kastellpaolitines 1 (KP1) et 5 (KP5) ainsi qu'avec la phénanthridine. Le résultat est très net : la 6-aminophénanthridine est encore plus active que les Kastellpaolitines et que la phénanthridine.

La figure 4 illustre les résultats de cette comparaison : l'activité de la 6-aminophénanthridine a été déterminée sur boîte et comparée à celle de la phénanthridine. Pour toutes les molécules, la même quantité est déposée (10 µl d'une solution à 10 mM). Dans le cas du témoin positif (chlorure de guanidium), la solution utilisée était à 300 mM.

Par conséquent, en greffant ce groupement amino, caractéristique des Kastellpaolitines sur la phénanthridine, les inventeurs ont augmenté fortement l'activité de cette dernière.

En suivant la même démarche, les inventeurs ont ensuite ajouté un chlore en position 8 dans la 6-aminophénanthridine (6AP) pour produire la 6-amino-8-chlorophénanthridine (6A-8CP). Cette modification a de nouveau augmenté l'activité du composé. Finalement, le chlore en position 8 a été remplacé

par un groupe trifluorométhyle pour donner la 6-amino-8-trifluorométhylphénanthridine (6A-8tFP). Comme le montre la figure 4, cette dernière modification a conduit à une augmentation supplémentaire de l'activité et la 6A-8tFP
5 représente actuellement un des composés les plus actifs.

Exemple 3 : Synergie entre les produits isolés à l'aide du crible et le chlorure de guanidium

10

Toutes les molécules actives ont été isolées dans un milieu contenant une faible dose de chlorure de guanidium (200 μ M / dose efficace = 4 mM). Ce parti pris établi lors de la mise au point du crible répondait au souci d'augmenter la sensibilité
15 (et donc le seuil de détection de la méthode). L'effet des molécules dans des milieux contenant plus (500 μ M) de chlorure de guanidium ou n'en contenant pas, a par la suite été observé. La phénanthridine est toujours active sur un milieu sans chlorure de guanidium, mais son activité augmente
20 fortement en fonction de la quantité de chlorure de guanidium (pourtant en dose nettement sub-efficace) dans le milieu. Ce résultat indique une synergie d'action entre le chlorure de guanidium et la phénanthridine. Le même résultat a été obtenu
pour toutes les autres molécules isolées par les inventeurs
25 (les Kastellpaolitines, la 6-aminophénanthridine et ses dérivés).

30 Exemple 4 : Vérification de la cure en milieu liquide

Les inventeurs ont ensuite voulu déterminer si les halos rouges observés dans le test levure correspondaient bien à de la cure du prion [PSI+] et non pas à un artéfact (par exemple

ces halos rouges pourraient être dus à une inhibition directe de la chaîne de biosynthèse de l'adénine par ces molécules, ce qui conduirait à une accumulation de l'AIR). Si ces molécules curent efficacement le prion [PSI+], un traitement en culture
 5 liquide de cellules [PSI+] suivi d'un lavage desdites cellules doit leur permettre de former des colonies rouges sur un milieu gélosé ne contenant plus les molécules. Ces tests ont été réalisés avec la 6-aminophénanthridine sur la souche « strong » sauvage 74-D694.

10

Les conditions de cure en milieu liquide sont les suivantes : une souche [PSI+] est cultivée pendant 5 jours en milieu liquide en présence des quantités indiquées des différents produits (voir figure 5). Toutes les 24H, une fraction
 15 aliquote est lavée en milieu vierge de tout produit et déposée sur un milieu gélosé solide (lui aussi vierge de tout produit) qui est traité ensuite comme indiqué en figure 2.

Comme montré dans la figure 5, la 6-aminophénanthridine est
 20 capable de curer partiellement le prion [PSI+] dans un nombre significatif de cellules. L'efficacité de cure peut être notablement augmentée en rajoutant une dose sub-efficace (100 μ M) de chlorure de guanidium dans le milieu de culture. Dans une telle cure liquide, le même effet synergique que celui
 25 observé dans le test sur boîte est également retrouvé.

Exemple 5 : Mise au point et utilisation d'un crible colorimétrique secondaire basé sur l'utilisation de [URE3], un
 30 autre prion de levure

Un autre test rapide sur boîte a été réalisé, basé sur un autre prion de levure : [URE3]. Ce test constitue un crible secondaire qui permet de généraliser l'effet des produits

isolés lors du crible primaire à un autre prion de levure. De la sorte, il est possible d'écarter les molécules actives uniquement contre le prion [PSI⁺] et donc moins intéressantes car d'un effet non général.

5

Pour le prion [URE3] la souche haploïde utilisée est CC34 (Mat a, *trp1-1*, *ade2-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*, *ura2::HIS3*).

10

La souche NT34 qui a servi pour le crible secondaire a été construite à partir de CC34, souche dans laquelle la phase codante du gène *DAL5* a été remplacée par celle du gène *ADE2* en utilisant la même méthode que celle utilisée pour la construction de la souche STRg6. Pour cela une cassette de délétion correspondant au gène *ADE2* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *DAL5* a été produite par PCR en utilisant de l'ADN génomique de la souche haploïde BY4742 (Mat a, *his3Δ1*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*) comme matrice et les oligonucléotides :

15

20

ACAACAAAACAAGGATAATCAAATAGTGTAATAAAAAAAAAAATTCAAGATGGATTCTAGAACAG
TTGG (SEQ ID N°5) (5'), et,

TATATTCTTCTCTGATAACAATAATGTCAGTGTATCTCACCCTATTATTACTTGTTTTCTA
GATAAGC (SEQ ID N°6) (3') comme amorces.

25

La mutation *dal5::ADE2* a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche NT34 comme matrice et les oligonucléotides :

ATAGTCTCTGCTCATAG (SEQ ID N°7) (5'), et,

GCTTACAGAAATTCTAC (SEQ ID N°8) (3') comme amorces.

La souche NT34 (Mat a, *trp1-1*, *ade2-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*, *ura2::HIS3*, *dal5::ADE2*) a été déposée à la CNCM le 10 octobre

30 2002 sous le numéro I-2942.

Ce crible est basé sur le même système colorimétrique que le crible primaire. Dans la souche de levure NT34, le gène *ADE2* n'est plus sous contrôle de son propre promoteur, mais sous

celui du gène *DAL5*. Lorsque la protéine Ure2p est sous forme prion ([*URE3*]), la transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est activée donc le gène *ADE2* est exprimé, donc les souches sont blanches et autotrophes pour l'adénine. Lorsque la protéine Ure2p est sous forme normale ([*ure3-0*]), la transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est réprimée donc le gène *ADE2* n'est pas exprimé, donc les souches sont rouges et auxotrophes pour l'adénine. Lorsque la souche NT34 est traitée avec 5mM de chlorure de guanidium pendant une dizaine de générations, elle forme des colonies rouges (comme attendu et comme le ferait la souche [*PSI+*] utilisée pour le criblage primaire). Comme on peut l'observer sur la figure 6, la phénanthridine et la 6-aminophénanthridine provoquent l'apparition d'un halo rouge lorsqu'elles sont déposées sur le petit filtre lui-même déposé sur le tapis de cellules préalablement étalées sur le milieu nutritif gélosé (même procédé que pour le crible primaire, voir figure 2). Ce résultat suggère que ces produits sont également actifs sur le prion [*URE3*]. Il est à noter, toutefois, que ce crible secondaire est nettement moins sensible que le crible primaire. Il est donc très utile pour observer rapidement si l'effet des molécules isolées lors du premier crible est généralisable à d'autres prions de levure mais en aucun cas il ne saurait se substituer au crible primaire.

Afin d'augmenter la perméabilité cellulaire, la séquence codante du gène *ERG6* a également été remplacée par celle du gène *TRP1*. Dans cette souche (SB34), la transcription de *ADE2* dépend donc de l'état de Ure2p : si Ure2p est inactivé par un mécanisme prionique (cellules [*URE3*]), le gène *ADE2* est transcrit activement alors que dans les cellules [*ure3-0*], il ne l'est pas. Donc, les cellules [*URE3*] de la souche SB34 formeront des colonies blanches alors que les cellules [*ure3-0*] formeront des colonies rouges. Du fait que cette souche

contient toujours l'allèle *ade2-1*, il a été envisagé que cette souche pourrait être [PSI+], de sorte que la coloration rouge pourrait être due au curage de [PSI+] plutôt que de [URE3]. Cette possibilité a été exclue en vérifiant par cytoduction et conjugaison que la souche est bien [URE3]. En plus, la séquence codante entière du gène *ade2-1* a été délétée pour donner la souche NT35. Cette souche a également formé des colonies blanches, démontrant de nouveau qu'il s'agit bien de [URE3].

10

La souche SB34 a été construite en remplaçant le gène *ERG6* dans CC34 par amplification PCR du marqueur *TRP1* et en remplaçant la région codante du gène *DAL5* par le gène *ADE2* en utilisant une méthode basée sur la PCR par délétion du gène *ERG6* avec les amorces (5'-ACAACAAAACAAGGATAATCAAATAGTGTAACAAAAA
AAAATTCAAGATGGATTCTAGAACAGTTGG-3') (SEQ ID n°9) et 342 (5'-TATATTCTTCTCTGATAACAATAATGTCTAGTGTATCTCACCCTATTATTACTTGTCTTAG
ATAAGC-3') (SEQ ID N°10). Ce remplacement de gène a été ensuite confirmé par croissance sur le milieu SD-Ade, en l'absence de croissance sur le milieu USA (comme prévu pour une souche *dal5Δ*) et par PCR analytique sur l'ADN génomique. Le phénotype [URE3] de cette souche a été vérifié par cytoduction : parmi 30 cytoducteurs, 26 ont été capables de croître sur le milieu USA, montrant qu'il s'agissait de [URE3]. La souche NT35 a été construite en remplaçant le gène *ade2-1* dans la souche SB34 par le marqueur KanMX amplifié par PCR et en vérifiant le remplacement réussi du gène par PCR analytique sur l'ADN génomique.

30 Exemple 6 : Vérification de la cure de [URE3] en milieu liquide

Deux types d'expériences ont été menés afin de vérifier que l'effet observé sur boîte avec la souche NT34 correspond bien à de la cure. Tout d'abord, des cellules dans les zones

environnant les filtres ont été récupérées pour le témoin négatif (DMSO), positif (chlorure de guanidium) pour la phénanthridine et pour la 6-aminophénanthridine. Ces cellules ont ensuite été striées sur un milieu frais exempt de toutes ces molécules. Les cellules récupérées autour des filtres forment toutes des colonies rouges, à l'exception de celles récoltées autour du témoin négatif. Ce résultat montre que la coloration rouge observée sur boîte pour la souche NT34 correspond bien à une cure et non à un artéfact lié à une inhibition d'une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine (dans ce cas, la coloration rouge serait perdue sur un milieu sans inhibiteur). L'effet de cure de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine a également été vérifié directement sur le prion [URE3]. Des cellules [URE3] de la souche CC34 poussent sur un milieu appelé USA alors que des cellules curées ([ure3-0]) sont incapables de pousser sur ce milieu. Les inventeurs ont examiné la capacité de cellules [URE3] traitées par 200 μ M de chlorure de guanidium (témoin négatif), par 5 mM de chlorure de guanidium (témoin positif) ou par différentes doses de 6-aminophénanthridine (seule ou en combinaison avec 200 μ M de chlorure de guanidium) à pousser sur un milieu USA. La 6-aminophénanthridine est capable de curer le prion [URE3] de façon significative et, tout comme pour le prion [PSI+], cet effet est accentué par une faible dose de chlorure de guanidium (200 μ M). Ces résultats, outre le fait qu'ils valident le crible secondaire avec la souche NT34, suggèrent que l'effet des inhibiteurs mis en évidence par ledit crible devrait être général sur tous les prions de levure.

Exemple 7 : Validation du crible avec deux molécules actives sur le prion des mammifères PrP : la chlorpromazine et la quinacrine

Le laboratoire de Stanley Prusiner, père de l'hypothèse
 5 « protéine seule » et prix Nobel en 1997, a isolé un certain nombre de molécules actives sur le prion de mammifère PrP grâce à un système de cellules murines (neuroblastomes) chroniquement infectées par le prion PrP^{Sc} (Korth et al., 2001). Ce système, de par sa lourdeur et sa complexité, ne
 10 permet pas un criblage massif comme celui mis au point par les inventeurs. Aussi l'approche du groupe de Stanley Prusiner a-t-elle été de tester une à une, parmi des molécules déjà utilisées comme médicaments, celles qui passent la barrière hémato-encéphalique. Certaines molécules, comme notamment la
 15 quinacrine (utilisée comme anti-paludéen depuis longtemps) ou la chlorpromazine (un anti-dépresseur) présentent une activité notable dans leur système. De façon à valider le crible, les inventeurs ont donc testé la chlorpromazine et la quinacrine dans leur système levure. Comme montré dans la figure 7, ces
 20 deux molécules présentent une certaine activité contre le prion [PSI+]. Il faut toutefois noter que leurs activités sont nettement inférieures à celle de la 6-aminophénanthridine. On peut également relever que la chlorpromazine et la quinacrine, tout comme l'ensemble des molécules mis en évidence par
 25 l'invention, présentent une forte synergie d'action avec le chlorure de guanidium (Sur la figure 7, le milieu utilisé contient 200 µM de chlorure de guanidium). Ce dernier résultat suggère que ces deux molécules agissent sur la même voie biochimique que les molécules isolées selon l'invention.

30

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la quinacrine, dont l'activité est environ dix fois supérieure à celle de la chlorpromazine dans le test du Pr. Prusiner, présente également une activité nettement supérieure à celle-ci dans le crible

mis au point par les inventeurs. En outre, tout comme dans le test du Pr. Prusiner, la chlorpromazine et la quinacrine nécessitent un traitement prolongé (au moins 6 jours dans le cas du test du Pr. Prusiner, au moins deux à trois jours dans le cas du crible selon l'invention) avant de déceler une activité.

De plus, les inventeurs ont déterminé l'activité, dans le test selon l'invention, d'autres molécules isolées grâce au test basé sur les neuroblastomes de souris, mis au point par le Pr. Prusiner. Il a été trouvé une bonne corrélation entre les résultats obtenus dans les deux systèmes : l'acépromazine qui s'est révélée être légèrement active dans le système mammifère a également présenté une faible activité dans le test selon l'invention et les molécules inactives dans l'analyse sur les mammifères comme la carbamazépine, l'imipramine, l'halopéridol, le chlorprothixène ou le bleu de méthylène ont été également inactives dans le test.

La quinacrine a été également décrite comme inhibiteur de la résistance multiple aux médicaments (MDR). Pour tester si son effet anti-prionique pourrait concerner ce mécanisme (qui est compatible avec l'effet synergique du GuHCl), nous avons évalué l'effet curatif putatif d'un inhibiteur général de MDR efficace, le vérapamil. Comme le montre la figure 7, bien qu'une concentration forte de ce médicament ait été utilisée, concentration proche de la toxicité, aucun effet curatif n'a pu être décelé.

Toutes ces corrélations entre l'activité de la quinacrine et de la chlorpromazine selon le test ou le crible utilisé permettent de valider l'utilisation de la méthode selon l'invention pour réaliser des criblages haut débit en vue d'isoler des molécules susceptibles de constituer des

médicaments efficaces (sur les mammifères et en particulier sur l'homme) contre des maladies neurodégénératives impliquant des agrégats protéiques, de type encéphalopathies spongiformes, maladies d'Alzheimer, de Huntington...

5

Exemple 8 : Analyse de l'inhibition de la PrP^{Sc} dans les cellules ScN2a-22L

Des cellules de neuroblastome de souris infectées par le prion de la tremblante du mouton (ScN2a-22L) ont été utilisées. Les cellules ont été cultivées dans des flacons de 25 cm² en présence ou absence des composés pendant plusieurs jours. Ensuite, les protéines ont été extraites des cellules ScN2a-22L par lyse cellulaire dans 500 µl de tampon de lyse (50 mM de Tris HCl pH 7,5 ; 150 mM de NaCl, 0,5 % de désoxycholate de sodium ; 0,5 % de Triton X100). Après normalisation des protéines avec le kit *Uptima Interchim*, les quantités ajustées de lysats cellulaires ont été digérées par la protéinase K à 20 µg/ml (*Eurobio*) pendant 40 min à 37°C. Les lysats ont été centrifugés ensuite pendant 90 min à 20 000 x g et le culot a été resuspendu dans 25 µl de tampon dénaturant (1 X Tris-Glycine ; 4 % de SDS, 2 % de β-mercaptoéthanol ; 5 % de sucrose et du bleu de bromophénol) et chauffé pendant 5 min à 100°C avant analyse par Western blot selon le protocole standard en utilisant l'anticorps monoclonal de souris anti-PrP SAF83 (fourni par *SPI-BIO*, Massy-Palaiseau, France). Les pourcentages d'inhibition de la formation de PrP^{Sc} résistant à la protéinase K ont été calculés en utilisant le *NIH Image J* : l'inhibition de l'accumulation de la PrP^{Sc} a été de 96 % pour la chlorpromazine (Chlor.) et 70 % +/- 6 % pour la KP1.

Deux des composés sélectionnés (KP1 et 6AP) ont été testés dans ce système mammifère. Comme le montre la figure 8, la KP1 a été capable d'induire une diminution significative de

l'accumulation de prion mammifère à une dose similaire à celle utilisée pour la chlorpromazine (5 μ M). Au bout de 7 jours de traitement, 70 % de la PrP^{sc} résistant à la protéinase K ont disparu (puits 1 à 3) comparé aux cellules non traitées (puits 4 et 5). Cet effet significatif a été probablement sous-estimé puisque les cellules traitées avec le solvant des composés seul (DMSO 0,01 %) ont montré une hausse significative et reproductible en PrP^{sc} résistant à la protéinase K (puits 6). Le même effet sur l'élimination de la PrP^{sc} a été obtenu avec la 6AP à 2 et 4 μ M.

Ces résultats valident donc l'utilisation du test de criblage selon l'invention basé sur la levure pour isoler les composés anti-prions puisque la quinacrine et la chlorpromazine ont été détectées en utilisant cette analyse et que la KP1 et 6AP ont été également efficaces pour favoriser l'élimination du prion mammifère *in vitro*.

Exemple 9 : Etude structure/activité

Dans le but d'étudier les différentes positions de substitution des molécules anti-prions isolées, les inventeurs ont réalisé une étude structure/activité sur la molécule de 6-aminophénanthridine. Les molécules de 2-fluoro-6-aminophénanthridine (2F-6AP), 2-fluoro-6-amino-8-chlorophénanthridine (2f-6A-8ClP) et 6-amino-7-chlorophénanthridine (6A-7ClP) ont ainsi été obtenues par synthèse chimique et leur activité anti-prion a été déterminée en utilisant le test selon l'invention. Les résultats obtenus sont repris par la figure 9. Les diamètres des halos rouges obtenus étant proportionnels à l'activité anti-prions des molécules déposées, les résultats indiquent que la présence d'un substituant de type halogène au niveau des positions 7 ou 8 accroît l'activité anti-prion des molécules de formules (II)

tandis que le même type de substituant en position 2 tend à la diminuer.

Références bibliographiques

- 5 Fernandez-Bellot et al., "The protein-only theory and the yeast
 Saccharomyces cerevisiae: the prions and the
 propagons", CMLS, 2001, 58:1857-1878.
- 10 Korth C. et al., "Acridine and phenothiazine derivatives as
 pharmacotherapeutics for prion disease",
 PNAS, 2001, 98(17):9836-9841.
- 15 Mettey Y. et al., "Synthesis of 11-Aminodibenzo[b,f][1,4]
 thiazepines and Fluoro derivatives", J.
 Heterocyclic Chem., 1997, 34:465-467.
- Kessar S.V. et al., Tetrahedron Letters, 1969, 1151.

Revendications

1. Kit de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.
2. Kit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène *ERG6* de la souche [PSI+] est inactivé.
3. Kit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.
5. Kit selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de curage des prions est le chlorure de guanidium.
6. Méthode de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :
 - a. réalisation d'un tapis de cellules in vitro
 - b. dépôt des composés à tester selon la méthode de l'antibiogramme,
 - c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
 - d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.
7. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé.
8. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'étape a. comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

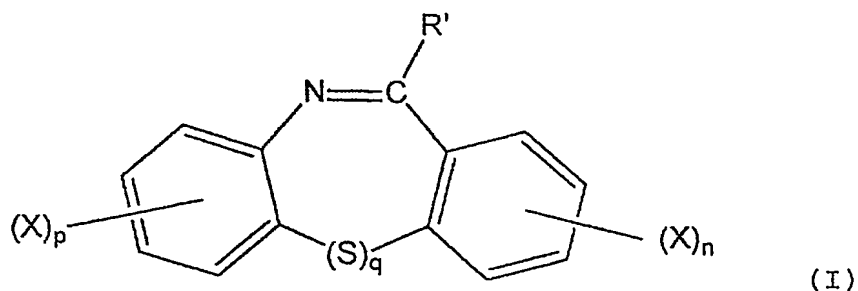
10. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre les étapes suivantes :

- 10 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C, et/ou,
- f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

11. Méthode de criblage selon la revendication 10, caractérisée en ce que le test de criblage secondaire comporte les étapes suivantes :

- construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
- 20 - réalisation des étapes a. à e. des méthodes selon les revendications 6 et 10, l'étape a. comportant en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

25 12. Agents anti-prion de formule (I)



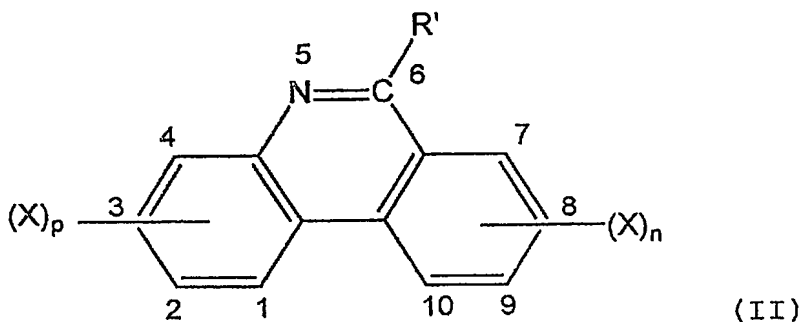
dans laquelle R' est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SCH_3 , OCH_3 , OH , NO_2 , $COCH_3$, $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones,

p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,

q égale 0 ou 1.

13. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (II) dans laquelle :

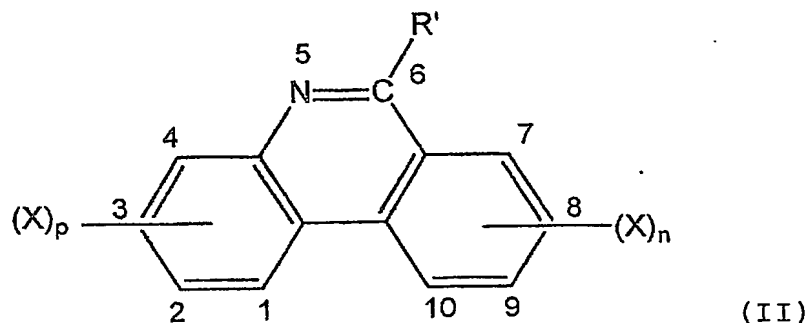


R' représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F , Cl , CF_3 ,

p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

14. Agents anti-prion selon la revendication 13, de formule (II) dans laquelle :



R' représente un groupement NH_2 ,

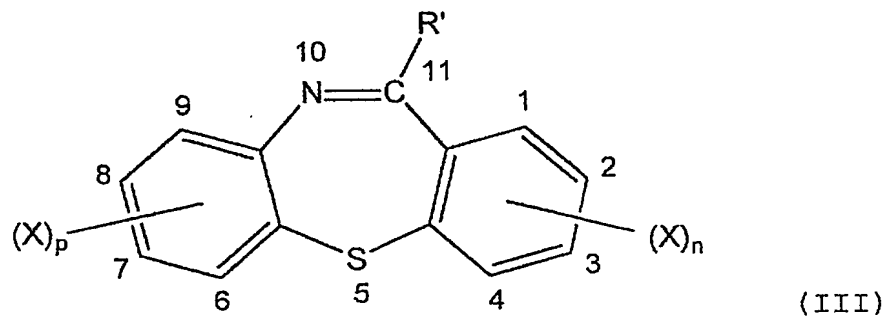
X représente F, Cl, CF_3 ,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

5

15. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (III) dans laquelle :

10



R' représente un groupement H, NH_2 , $\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-$, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_2-\text{CH}_3)_2$,

X représente F, Cl, CF_3 ,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

15

16. Utilisation des agents anti-prion selon l'une quelconque des revendications 12 à 15, pour l'obtention d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives impliquant des agrégats protéiques.

20

17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que les maladies sont les encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer et de Huntington.

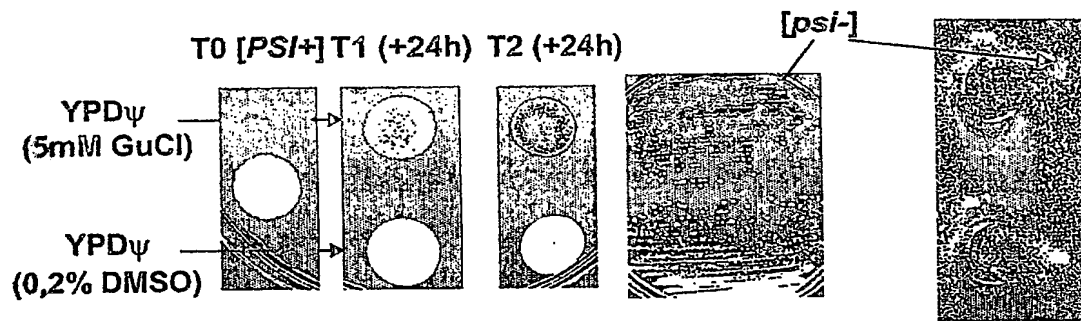


Figure 1

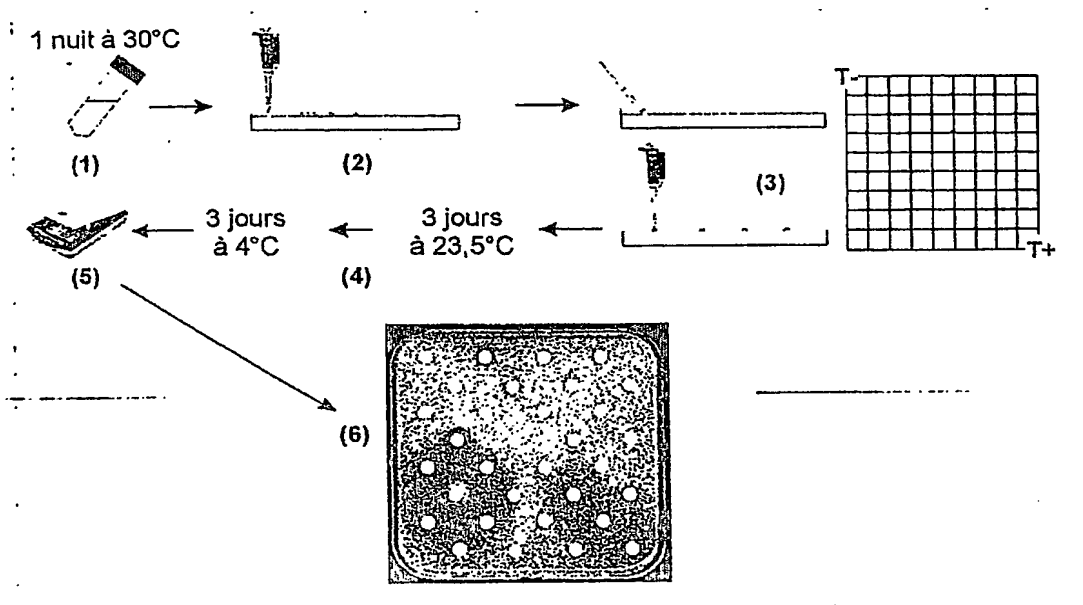


Figure 2

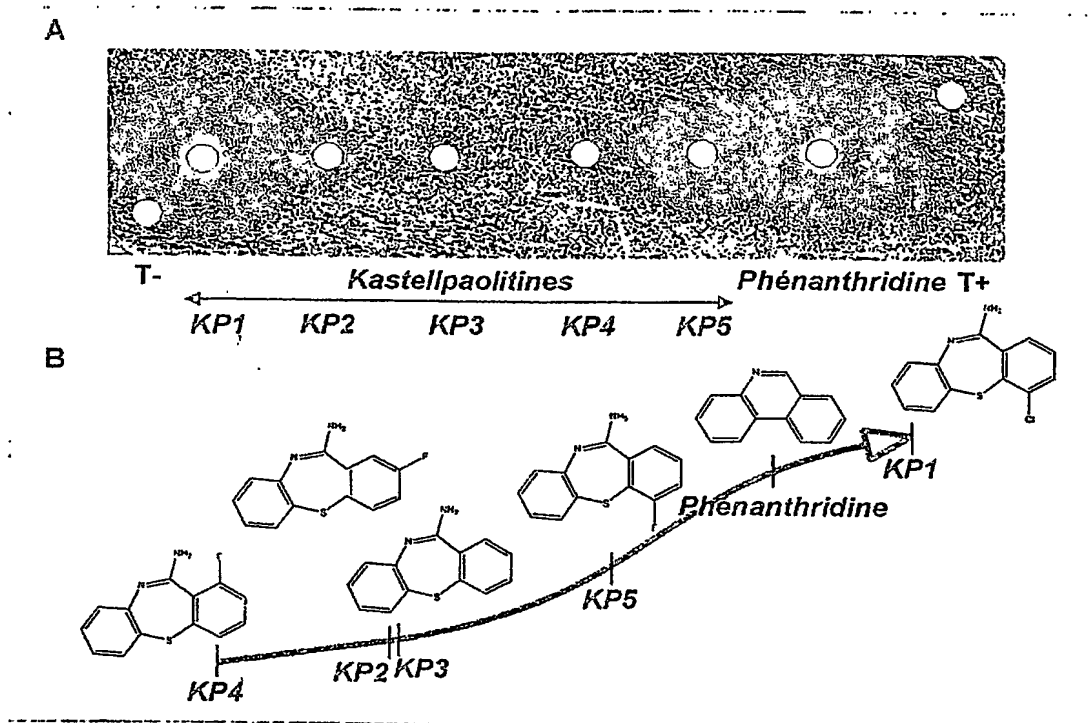


Figure 3

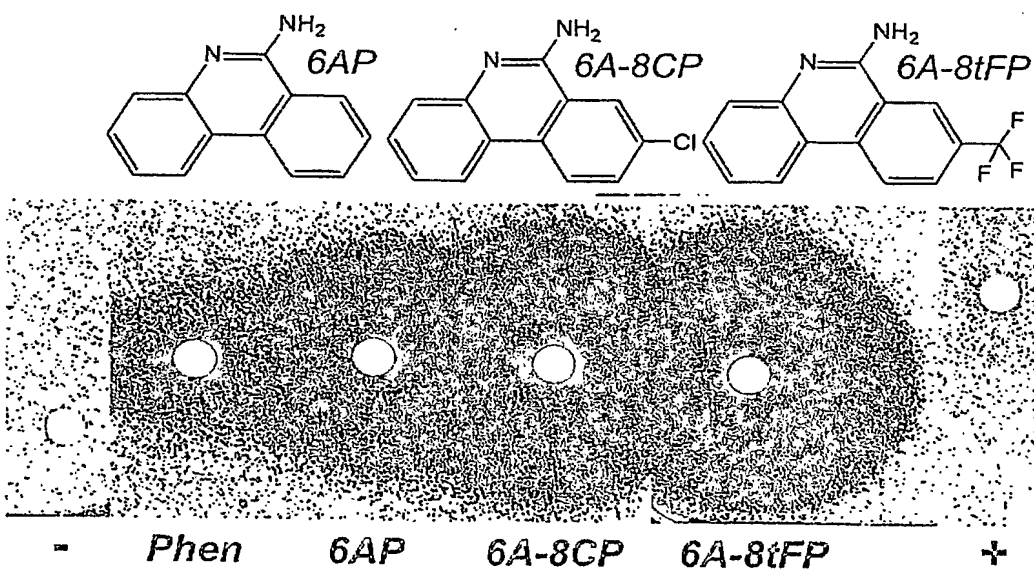


Figure 4

T-
(100 μ M GuHCl)

T+
(4mM GuHCl)

100 μ M GuHCl
+ 100 μ M
6-aminophénantridine

100 μ M GuHCl
+ 200 μ M
6-aminophénantridine

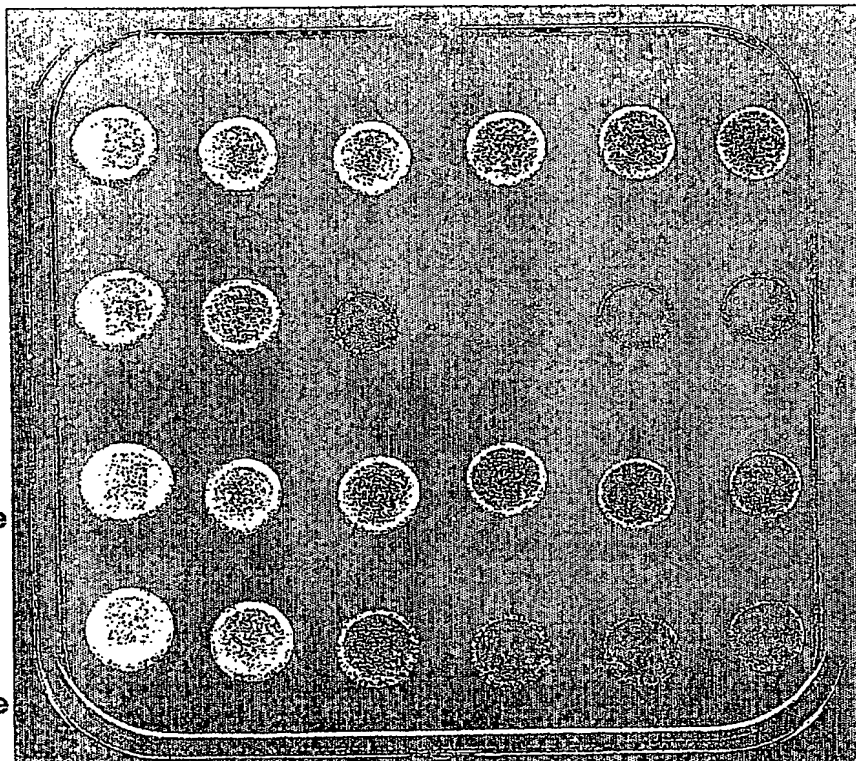


Figure 5

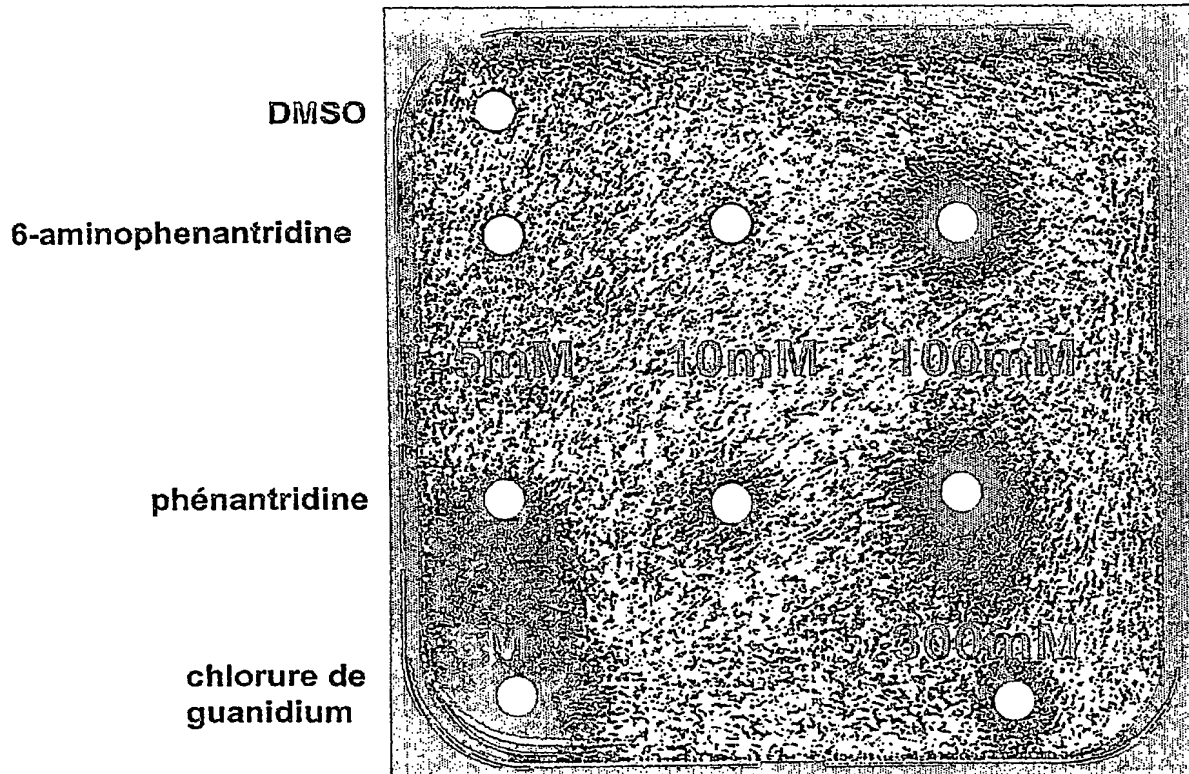


Figure 6

STRg6
0.2 mM GuHCl

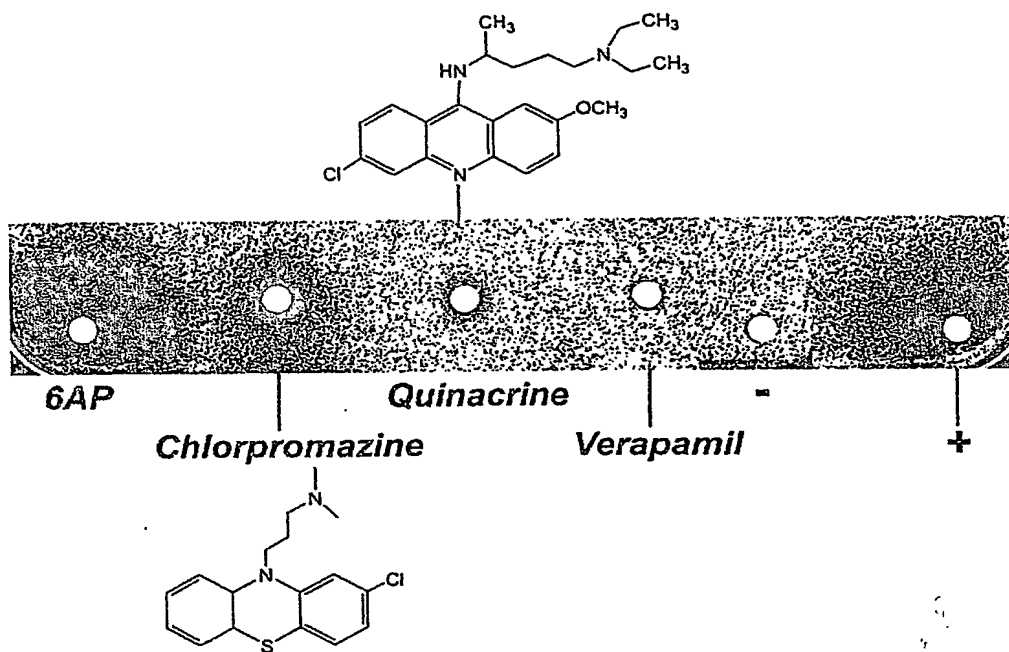


Figure 7

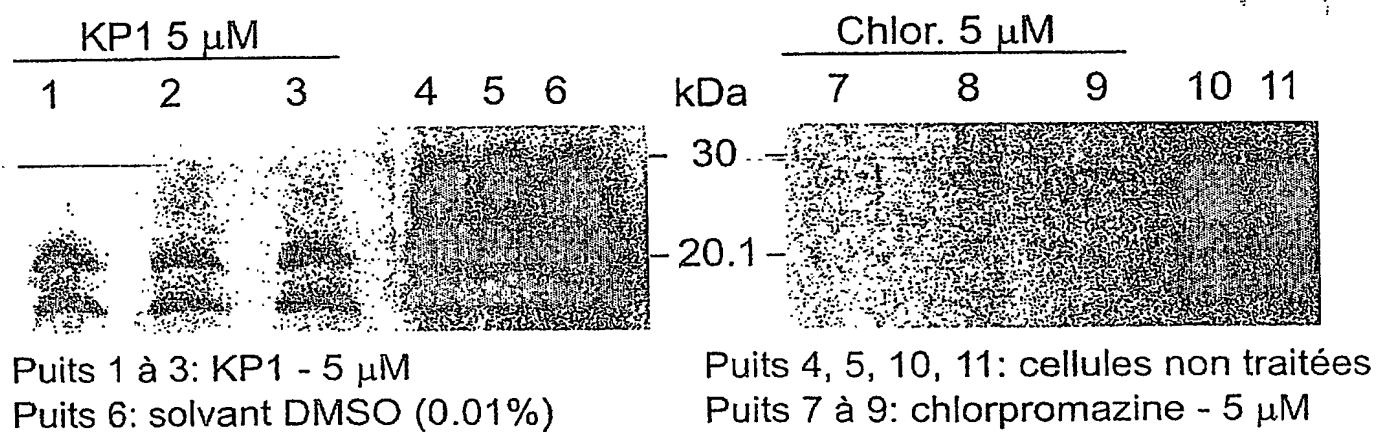


Figure 8

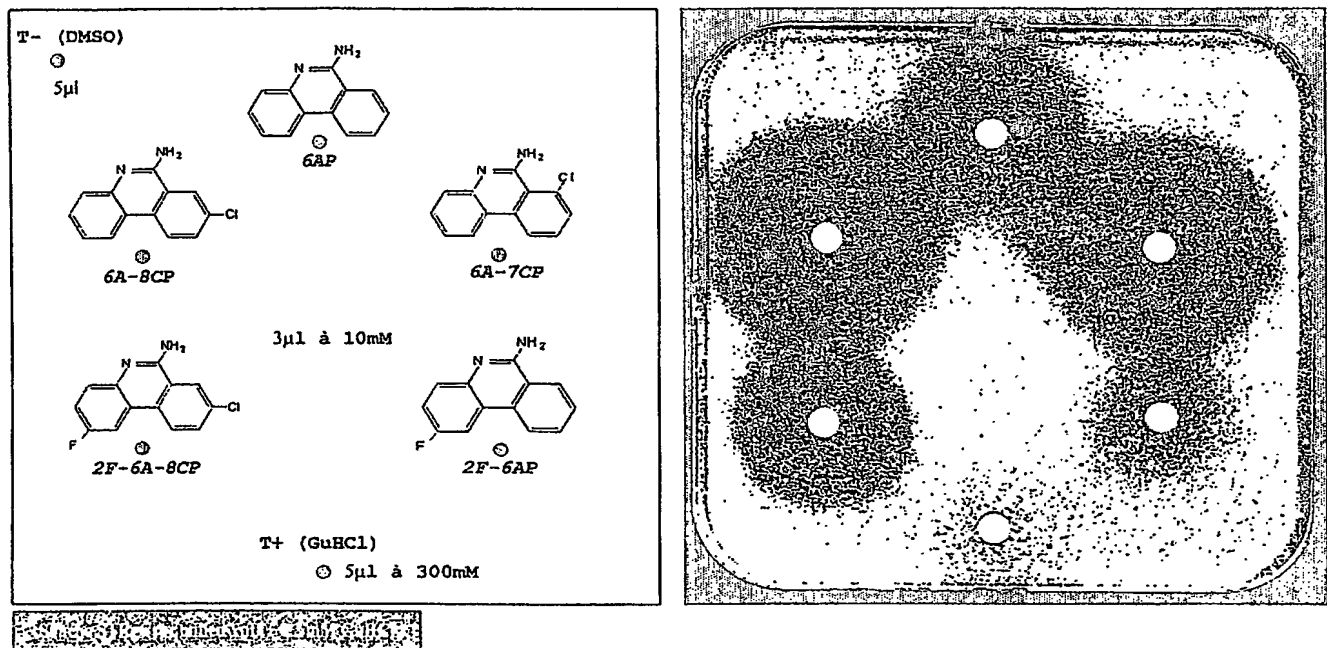


Figure 9

**BREVET D'INVENTION****CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*03

DÉPARTEMENT DES BREVETS26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../2..(À fournir dans le cas où les demandeurs et
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif) CP 61032

N° D'INREGISTREMENT NATIONAL 0303289

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES

LE(S) DEMANDEUR(S) :

C.N.R.S., UNIVERSITE VICTOR SEGALEN, et UNIVERSITE DE POITIERS

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BLONDEL	
	Prénoms	Marc	
Adresse	Rue	54, Rue de la Rive	
	Code postal et ville	[2][9][2][5][0] SAINT POL DE LEON	
Société d'appartenance (facultatif)		CNRS	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	BACH	
	Prénoms	Stéphane	
Adresse	Rue	3, cité de Kermenguy	
	Code postal et ville	[2][9][2][5][0] SAINT POL DE LEON	
Société d'appartenance (facultatif)		CNRS	
<input checked="" type="checkbox"/>	Nom	CULLIN	
	Prénoms	Christophe	
Adresse	Rue	11, Impasse Vivaldi	
	Code postal et ville	[3][3][7][0][0] MERIGNAC	
Société d'appartenance (facultatif)		Université Victor Segalen	

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)le 07 Juillet 2003
Mandataire Chantal PEAUCELLE
n° 92-1189

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2../2..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		CP 61032
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0208189
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION : KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
C.N.R.S., UNIVERSITE VICTOR SEGALEN, et UNIVERSITE DE POITIERS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		TALAREK
Prénoms		NICOLAS
Adresse	Rue	135, rue Jean Jaurès Apt 23 Res La Malvoisie
	Code postal et ville	3334000 TALENCE
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		VIERFOND
Prénoms		Jean Michel
Adresse	Rue	2, rue Molière
	Code postal et ville	94700 MAISONS ALFORT
Société d'appartenance (facultatif)		UNIVERSITE DE POITIERS
3 Nom		METTEY
Prénoms		Yvette
Adresse	Rue	5, rue de l' ancienne Comédie
	Code postal et ville	86000 POITIERS
Société d'appartenance (facultatif)		UNIVERSITE DE POITIERS
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Le 07 juillet 2003 Madataire : Chantal PEAUCELLE n° 92-1189		

Chantal Peaucelle

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.